

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 25 049 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 01 K 67/027**  
// C12N 15/54

②1 Aktenzeichen: 196 25 049.8  
②2 Anmeldetag: 22. 6. 96  
④3 Offenlegungstag: 2. 1. 98

DE 196 25 049 A 1

⑦1 Anmelder:

Institut für Pflanzengenetik und  
Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben, DE

⑦2 Erfinder:

Becker, Klaus, Dr., 06466 Gatersleben, DE; Kaina,  
Bernd, Prof., 69493 Hirschberg, DE

⑤4 Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, das ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthält

⑤7 Die Erfindung beschreibt ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier (speziell eine Maus), dessen Körper- und Geschlechtszellen ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthalten, das dem Ursprungstier auf parasexuellem Wege im 1- bis 8-Zellstadium der Embryonalentwicklung übertragen wurde.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, insbesondere die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen, und die pharmazeutische Industrie.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein transgenes Tier zur Verfügung zu stellen, welches geeignet ist, detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung zellulärer Schutzmechanismen und spezifischer DNA-Schäden im Prozeß der Tumorentstehung durchzuführen. Damit sollen neue Impulse für die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen ermöglicht werden.

Dieses Ziel wird gemäß der Erfindung mit einem transgenen, nicht-menschlichen Säugetier erreicht, welches ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthält, welches eine Funktion kodiert,

- die der Entfernung von alkylierten DNA-Läsionen dient, wobei die kodierte Funktion eine O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist, oder
- die eine Korrektur von UV-induzierten Schäden bewerkstelligt.

Eine besonders bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht darin, ein zusätzliches rekombinantes Reparaturgen einzufügen, das in der Epidermis des beanspruchten Säugetiers exprimiert wird.

DE 196 25 049 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung beschreibt ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier (speziell eine Maus), dessen Körper- und Geschlechtszellen ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthalten, das dem Ursprungstier auf parasexuellem Wege im 1- bis 8-Zellstadium der Embryonalentwicklung übertragen wurde.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, insbesondere die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen, und die pharmazeutische Industrie.

Transgene Tiere stellen für die biomedizinische Forschung sehr wertvolle Modelle dar, mit denen es gelingt, durch das Hinzufügen, Verstärken oder den experimentell erzeugten Ausfall von Genfunktionen die Rolle bestimmter zelleigener Faktoren bei ortho- oder pathogenetischen Prozessen in vivo, also im Gesamtorganismus aufzuklären. Insbesondere in der Krebsforschung bieten transgene Tiermodelle die Möglichkeit, in Cancerogenese-Mechanismen experimentell einzugreifen. Die Krebsentstehung ist ein Mehrstufen-Prozeß, der mit der Initiation beginnt und sich über mehrere Stadien der Tumorpromotion und malignen Progression fortsetzt, bis ein klinisch diagnostizierbares Carcinom entstanden ist. Diesem Gesamtprozeß liegen verschiedene genetische und epigenetische Ereignisse zugrunde, die entweder spontan erfolgen oder durch chemische und physikalische Noxen induziert werden können; in jedem Falle handelt es sich um einen außerordentlich langwierigen Prozeß. Durch transgene Tiermodelle ist man in der Lage, bestimmte Ereignisse, die zur Generierung einer Krebserkrankung notwendig sind, experimentell zu verstärken bzw. die transgenen Tiere bereits mit Eigenschaften auszustatten, die sie entweder tumorresistenter oder tumoranfälliger machen, wobei sich in wesentlich kürzeren Zeiträumen Neoplasmen entwickeln können.

Derartige Modelle (z. B. US-Patent 4 736 866 der Harvard-Universität "Transgenic non-human mammals") können eingesetzt werden, um carcinogenverdächtige Substanzen (z. B. Arzneimittel) auf ihre krebsauslösende Wirkung zu untersuchen bzw. bestimmte Substanzklassen auf ihre eventuellen antineoplastischen Effekte zu untersuchen.

Es gibt bereits Tiermodelle, die zusätzlich Reparaturgene enthalten (S. Gerson et al., Mutat. Res. 307: 541—555, 94). Die Reparaturgene dieser Modelle wirken jeweils nur in bestimmten Organen (Leber bzw. Thymus) und sind damit nur bedingt in der Lage, die einzelnen Schritte der Cancerogenese (Initiation, Promotion, Progression) einer experimentellen Analyse zugänglich zu machen.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein transgenes Tier zur Verfügung zu stellen, welches geeignet ist, detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung zellulärer Schutzmechanismen und spezifischer DNA-Schäden im Prozeß der Tumorentstehung durchzuführen. Damit sollen neue Impulse für die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen ermöglicht werden.

Dieses Ziel wird erfindungsgemäß mit einem transgenen Tier gemäß den Ansprüchen 1—16 erreicht. Dieses Tier wird bevorzugt folgendermaßen erhalten: Die Übertragung des Transgenes erfolgt vornehmlich im Stadium der Zygote, so daß das Transgen, nachdem es in das Ergut (Genom) des sich entwickelnden Organismus integriert wurde, in allen seinen somatischen und generativen Zellen gleichermaßen vorhanden ist. Das Vorhandensein des Transgenes in den Keimzellen des auf diesem Wege hergestellten transgenen Tieres hat

zur Folge, daß auch die Nachkommen dieses Tieres das zusätzliche Gen im Genom aller ihrer Zellen enthalten.

Das für die Genübertragung verwendete DNA-Reparaturgen codiert ein Protein, das in der Lage ist, spezifische DNA-Primärschäden, die durch chemische oder physikalische Substanzen oder endogen in der Erbsubstanz (DNA) hervorgerufen werden, effizient zu entfernen und somit die Integrität der Erbsubstanz wieder herzustellen. DNA-Primärläsionen, die nicht oder falsch repariert werden, können zu Mutationen führen, die wiederum Erbkrankheiten hervorrufen oder die Ursache für die Entstehung von Tumoren sein können. Somit wird durch die Übertragung und Expression des zusätzlichen DNA-Reparaturgenes die Kapazität des betreffenden gentechnisch veränderten Säugetieres zur DNA-Schadenskorrektur erhöht und seine Tumor-Suszeptibilität verringert.

Die beanspruchten Tiere sind geeignete Modelle, die Bedeutung bestimmter DNA-Reparaturproteine als zelluläre Schutzmechanismen gegenüber der tumorinduzierenden Wirkung von exogenen und endogenen Noxen zu bestimmen. Eine signifikante Reduktion von Mutationen bzw. Tumoren in den beschriebenen transgenen Tieren nach Behandlung mit mutagenen/cancerogenen Substanzen ist der entscheidende Beweis dafür, daß es sich bei dem in diesem Tier exprimierten transgenen DNA-Reparaturprotein um einen entscheidenden protektiven Faktor des Säugers zur Verhinderung von Erbgutschäden bzw. Krebs handelt.

Da bestimmte DNA-Reparaturproteine zumeist nur ganz spezifische DNA-Primärschäden erkennen und reparieren, lassen sich aus der verminderten Mutations-/Tumorzinzidenz ebenfalls wichtige Rückschlüsse auf die zur Mutations-/Tumorauslösung entscheidenden DNA-Primärschäden ziehen.

Eine besonders bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht darin, ein zusätzliches rekombinantes Reparaturgen einzufügen, das in der Epidermis des beanspruchten Säugetiers exprimiert wird. Durch das Expressions-Targeting der genannten DNA-Reparaturgene in der Haut der beanspruchten Tiere kann man durch die Anwendung des Mehrphasen-Hautcarcinogenese-Modells die Bedeutung bestimmter Typen von chemisch oder physikalisch induzierten DNA-Primärschäden und von zellulären Schutzfunktionen während der Tumorentstehung, Tumorkonversion und -promotion sowie der malignen Progression feststellen.

Diese Erkenntnisse sind von großer Bedeutung für die Ableitung möglicher präventiver und therapeutischer Maßnahmen bei verschiedenen Krebserkrankungen des Menschen.

Das Kreuzen der beschriebenen transgenen Säugetiere (vornehmlich Mäuse), die ein zusätzliches DNA-Reparaturgen exprimieren, mit anderen transgenen Säugetieren (vornehmlich Mäuse), die z. B. bestimmte Markergene als Mutationstarget enthalten und als in vivo-Mutationsdetektions-Modelle für die Genotoxizitätsprüfung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie verwendet werden, läßt Aussagen darüber zu, inwieweit ein solcher artifizieller Mutationsmarker im Genom eines Säugetieres der Prozessierung von DNA-Schäden durch die Zelle zugänglich und damit der Mutabilität des Säugergenoms vergleichbar ist.

Damit läßt sich das beanspruchte transgene Modell, bei dem die Expression eines zusätzlichen DNA-Reparaturgenes gezielt in bestimmten Geweben, beispielsweise der Haut, erfolgt, exzellent einsetzen zur Abschätzung der Bedeutung spezifischer DNA-Primärschäden

für die Entstehung von bestimmten Tumortypen, die durch verschiedene chemische oder physikalische Noxen, beispielsweise UV-Strahlung, induziert werden können. Darüber hinaus erlaubt dieses beanspruchte transgene Modell, die Rolle von Proteinen, die in die Reparatur von DNA-Primärschäden involviert sind, bei der Prävention von malignen Entartungsprozessen zu charakterisieren.

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

#### 1. Herstellung des rekombinanten Transgenkonstruktes pCkMGMT (Abb. 1)

Der hautspezifische Expressionsvektor pCkMGMT wurde konstruiert durch das Einklonieren der cDNA-Sequenz des menschlichen O<sup>6</sup>Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens, die als 835 bp langes EcoRI-Fragment aus dem Vektor pKT 100 (Tano et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 686–690, 1990) isoliert wurde, in das 22kb CkIII/IV\*-Minilocus-Plasmid (Blesing et al, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 15: 11–21, 1993), das den bovinen Cytokeratin III- und Cytokeratin IV-Promoter sowie die entsprechenden Polyadenylierungssequenzen enthält. Mit Hilfe geeigneter Adapter wurde jeweils eine MGMT-cDNA-Kopie in den unikalen SalI-Ort hinter den CkIII-Promoter und in den unikalen ClaI-Ort hinter den CkIV-Promoter eingefügt. Die hierzu angewandten gentechnischen Methoden sind beschrieben bei Maniatis et al, "Molecular Cloning, a Laboratory manual", 1989.

#### 2. Herstellung der transgenen Mauslinie, die das rekombinante CkMGMT-Reparaturgen enthält

Das 22 kb SfiI-Fragment des Expressionsvektors pCkMGMT, das die menschliche MGMT-cDNA jeweils unter der Kontrolle des CkIII und des CkIV-Promoters enthält, wurde elektrophoretisch separiert von der prokaryotischen Vektorsequenz, aus dem Gel eluiert, über QIAex (Quiagen, USA) gereinigt und zur Abtrennung von QIAex-Partikeln zentrifugiert. Das aufgereinigte Fragment wurde in einer Konzentration von 25 µg/ml TE in den leichter zugänglichen der beiden Pronuklei der Zygote mikroinjiziert. Die Isolation der Zygoten, die Mikroinjektion und der Retransfer der manipulierten Zygoten in den Eileiter von Ammenmüttern wurden entsprechend den in Hogan et al, (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1994) beschriebenen Methoden durchgeführt.

#### 3. Identifizierung der CkMGMT-transgenen Tiere

Im Alter von 4–6 Wochen wurde den aus der Mikroinjektion hervorgegangenen Tieren ein Stück der Schwanzspitze entnommen und aus diesem Bioplat hochmolekulare DNA nach der bei Hogan et al. (s. oben) beschriebenen Methode isoliert. Jeweils 1 µg der hochmolekularen Maus-DNA wurde verwendet, um mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR) das Transgen im Genom der Tiere nachzuweisen. Der verwendete 5'-Primer bindet an den Positionen –142 bis –117 des Cytokeratin III-Promoters, der 3'-Primer bindet an der menschlichen MGMT-cDNA (Positionen +727 bis +748), wodurch ein 890 bp Fragment amplifiziert wurde, das nach elektrophoretischer Separation per Southern Blot-Analyse detektiert wurde. Die Trans-

gen-Integration in das Mausgenom wurde durch genomische Southern Blot-Analysen unter Verwendung von 25 µg DNA, die zuvor mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI, Sal I, Cla I, Kpn I und Aat II gespalten wurde, verifiziert. Als radioaktiv markierte DNA-Sonde diente in beiden Fällen das 835 bp Eco RI-Fragment der MGMTcDNA.

Die transgenen Tiere wurden mit nicht-transgenen Mäusen des gleichen Stammes verpaart und die Transmission des Transgenes mit den für die Identifizierung der Founder-Tiere beschriebenen Techniken geprüft. Die positiven G1-Nachkommen wurden untereinander verpaart und die homozygoten Tiere mittels quantitativer Phosphor-Imaging-Analyse selektiert.

#### 4. Charakterisierung der transgenen Mauslinie

Zum Nachweis der gewebespezifischen Expression des Transgenes wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen und Geweben der transgenen Tiere nach der Guanidiniumthiocyanat/Phenol-Methode (Chomczynski et al, Anal. Biochem. 162: 156–159, 1987) extrahiert und mittels Oligo-dT-Cellulose aufgereinigt. Die so erhaltene Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde in einem 1.4%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch separiert. Das Transgen spezifische Transkript wurde durch Northern Blot-Analyse mittels einer 835 bp Probe der menschlichen MGMTcDNA nachgewiesen. Die Existenz des funktionsfähigen menschlichen MGMT-Reparaturproteins wurde wie folgt geprüft. Gewebeprobe der transgenen Tiere wurden in Extraktionspuffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.5, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 10 mg/ml Aprotinin, 10 mM Bestatin, 10 mM Leupeptin, 0.1 mM PMSF) homogenisiert, einer Ultraschallbehandlung unterzogen und anschließend zentrifugiert. Jeweils 40 µg der aus den Zellextrakten isolierten Proteine wurden in einem 12.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Hilfe polyklonaler Kaninchen-Antikörper, die spezifisch die menschliche MGMT erkennen, detektiert. Zur Lokalisierung des transgenen MGMT-Proteins in den basalen und suprabasalen Epidermiszellen und den Zellen der Haarfollikel wurden immunohistochemische Nachweistechiken unter Verwendung der obengenannten Antikörper benutzt. Die Aktivität des transgenen Reparaturproteins in den epidermalen Zellen wurde durch den Transfer <sup>3</sup>H-markierter Methylgruppen von der O<sup>6</sup>-Position des Guanins <sup>3</sup>H-MNU-behandelter Kalbsthymus DNA quantitativ bestimmt (Preuss et al, Int. J. Cancer, 61: 321–326, 1995).

Die transgene Mauslinie CkMGMT-Tg3 exprimierte das in ihr Genom integrierte rekombinante DNA-Reparaturgen gewebespezifisch in der Haut, wobei das menschliche MGMT-Protein sich als biologisch aktiv erwies und in der interfollikulären Epidermis und den äußeren Zellen der Haarfollikel nachweisbar war.

#### 5. Carcinogenese-Untersuchungen

In Zweiphasen-Hautcarcinogenese-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß die Expression des zusätzlichen rekombinanten DNA-Reparaturgenes in der Epidermis der beschriebenen transgenen Tiere die Suszeptibilität dieser Tiere gegenüber der hautcarcinogenen Wirkung bestimmter Substanzgruppen signifikant verringert. Im einzelnen wurde die Tumorentstehung durch eine einmalige dermale "sub-threshold"-Dosis

N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU), einer methylierenden N-Nitrosoverbindung, herbeigeführt. 1 Woche nach der Initiation wurde die Tumorpromotion durchgeführt, indem zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 22 Wochen der Phorbolester TPA topikal appliziert wurde. Im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren des gleichen Stammes war die Hauttumorzinzidenz bei den beschriebenen CkMGMT-transgenen Mäusen drastisch reduziert (Abb. 2). Wurde den CkMGMT-transgenen Tieren jedoch 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA), das andere cancerogene DNA-Schäden als O<sup>6</sup>-Alkylguanin induziert, als Initiator verabreicht und nachfolgend TPA topikal appliziert, so war die Häufigkeit von Hauttumoren bei beiden Gruppen von Tieren gleich. Dies zeigt, daß

- das O<sup>6</sup>-Methylguanin die wichtigste präcarcinogene DNA-Primärläsion bei der MNU-induzierten Hautcarcinogenese darstellt,
- das MGMT-Reparaturprotein den entscheidenden protektiven Mechanismus der Zelle zur Prävention von Mutationen, die durch Alkylantien induziert werden und Ursprung für die Entstehung von Tumoren sein können, darstellt,
- eine gewebespezifische Erhöhung des MGMT-Gehaltes, wie durch die hautspezifische Expression des zusätzlichen rekombinanten MGMT-Reparaturproteins in transgenen Mäusen gezeigt wurde, der Zelle einen effizienten Schutz gegenüber der tumorbildenden Wirkung alkylierender Substanzen verleiht,
- die Schutzfunktion auf der schadensspezifischen Reparatur von präcarcinogenen DNA-Läsionen beruht,
- die protektive Wirkung des MGMT-Proteins gegenüber der hautcarcinogenen Wirkung von Alkylantien auf der Prävention der Tumorumitiation beruht und nicht durch eine Beeinflussung von Mechanismen der Tumorpromotion oder durch eine generelle Beeinträchtigung der Tumorsuszeptibilität zustande gekommen ist.

#### Patentansprüche

1. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, dessen somatische und Keimzellen ein zusätzliches rekombinantes DNA-Reparaturgen enthalten, das dem genannten Säugetier oder seinen Vorfahren auf parasexuellem Wege im frühen embryonalen Stadium übertragen wurde.
2. Säugetier gemäß Anspruch 1, das ein rekombinantes DNA-Reparaturgen in seinem Genom an einem anderen chromosomalen Ort als die ebenfalls im Genom des genannten Säugetieres vorhandene endogene, zum genannten DNA-Reparaturgen homologe DNA-Sequenz integriert hat.
3. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen eine Funktion kodiert, die der Entfernung von alkylierten DNA-Läsionen dient.
4. Säugetier gemäß Anspruch 3, dessen transgenes DNA-Reparaturgen eine O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) kodiert.
5. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen rekombinantes DNA-Reparaturgen eine Funktion kodiert, die die Korrektur von UV-induzierten DNA-Schäden bewerkstelligt.
6. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Säugetier stammt.

7. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Nicht-Säuger stammt.

8. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Bakterium stammt.

9. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen synthetisiert worden ist.

10. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen genanntes rekombinantes DNA-Reparaturgen unter der transkriptionellen Kontrolle eines vom endogenen Promoter verschiedenen Regulatorelementes steht.

11. Säugetier gemäß Anspruch 10, dessen genanntes rekombinantes DNA-Reparaturgen von einem gewebespezifisch regulierten Promoter kontrolliert wird.

12. Säugetier gemäß Anspruch 10, wobei der genannte Promoter induzierbar ist.

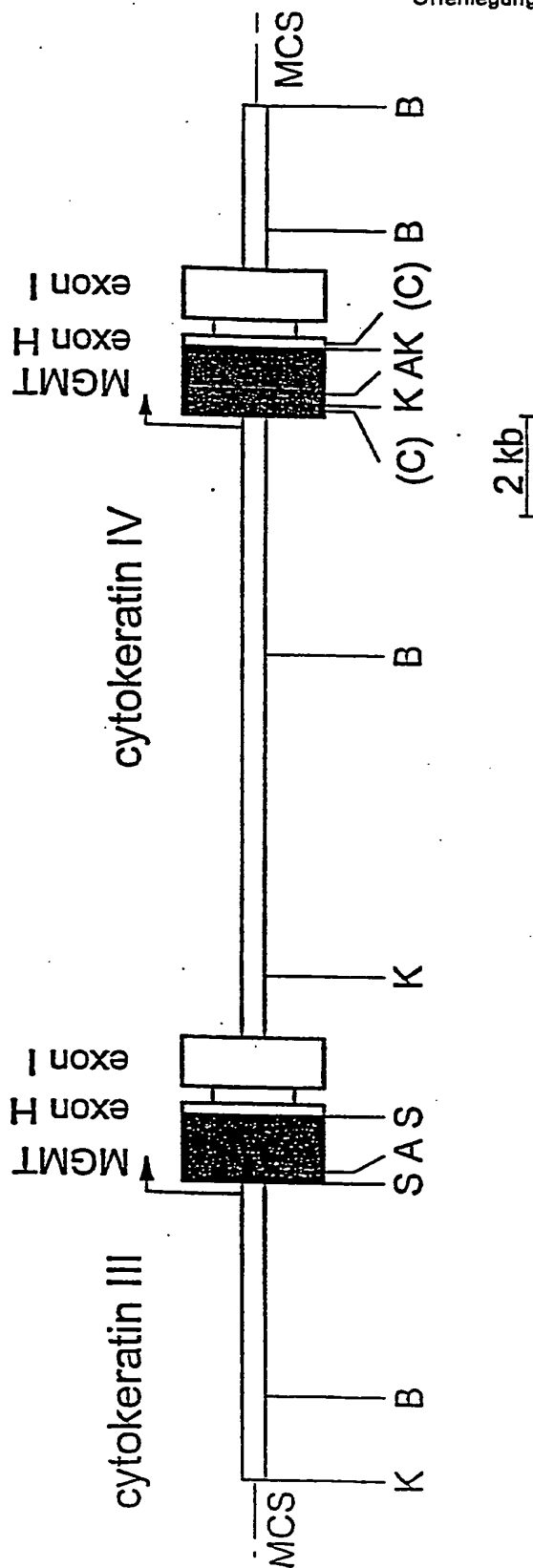
13. Säugetier gemäß Anspruch 11, wobei der genannte Promoter ein Kontrollelement der Keratinfamilie ist.

14. Säugetier gemäß Anspruch 11, dessen rekombinantes DNA-Reparaturgen in der Epidermis des genannten Säugetieres exprimiert wird.

15. Säugetier gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Säugetier ein Nagetier ist.

16. Säugetier gemäß Anspruch 15, wobei das genannte Säugetier eine Maus ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen



pCkMGMT (24kb)

A: Aat II, B: BamH I, C: Cla I, K: Kpn I, S: Sal I, MCS: multipler Klonierungsort

Abb. 1

702 061/325

BEST AVAILABLE COPY

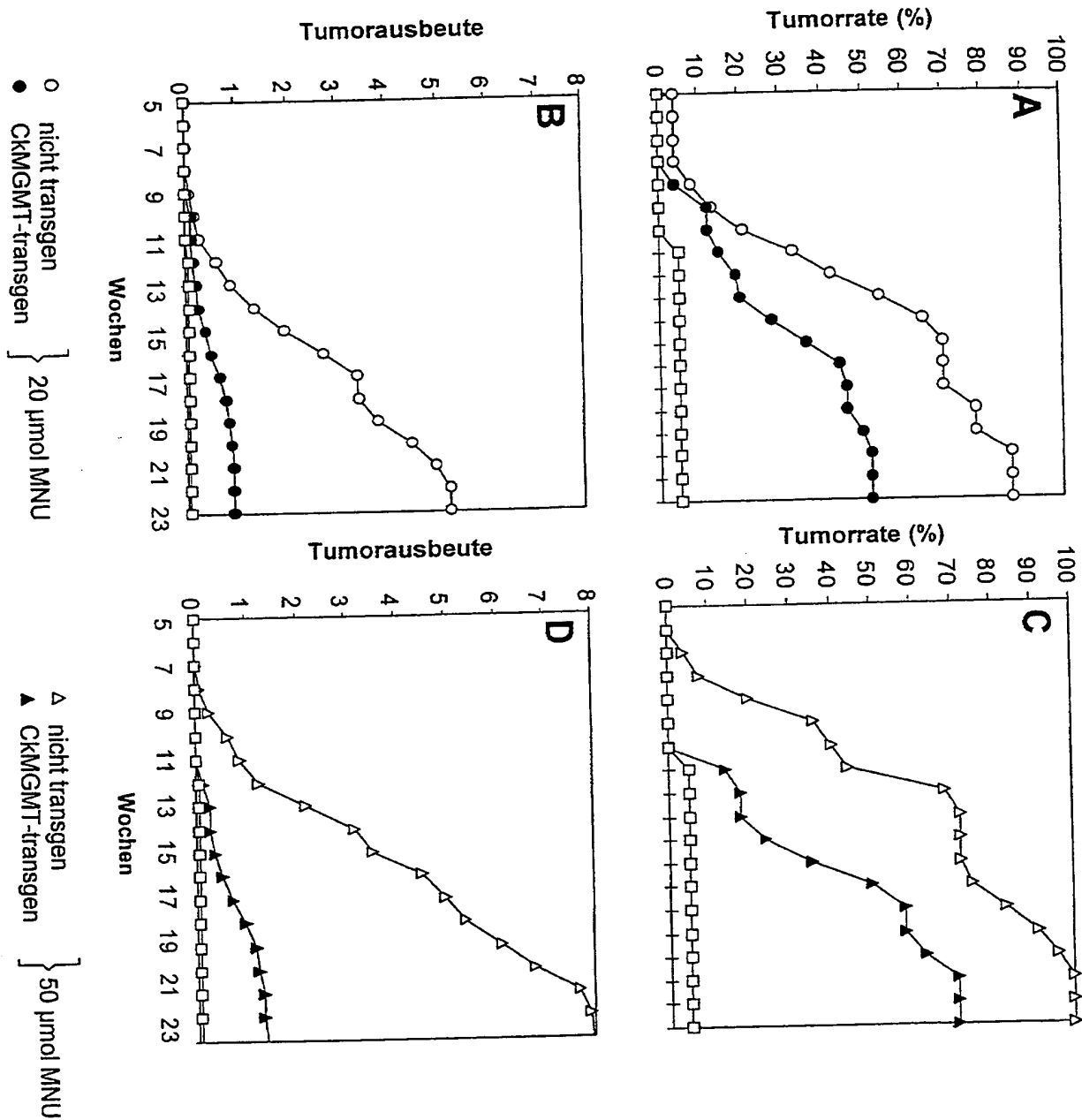


Abb. 2